

PENGARUH UMUR EKSPLAN TERHADAP KEBERHASILAN PEMBENTUKAN KALUS EMBRIOGENIK PADA KULTUR MERISTEM JAHE (*Zingiber officinale* Rose)

MEYNARTI SARI DEWI IBRAHIM¹⁾, OTIH ROSTIANA²⁾, dan NURUL KHUMAIDA³⁾

¹⁾ Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri
Jl. Raya Pakuwon-Parungkuda Km 2, Sukabumi, 43357

²⁾ Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik
Jl. Tentara Pelajar No. 3 Bogor, 16111

³⁾ Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, IPB
Jl. Meranti Darmaga Bogor, 16680

(Terima Tgl. 12 - 2- 2010 - Disetujui Tgl. 27 - 3 - 2010)

ABSTRAK

Kendala dalam pengembangan jahe di Indonesia adalah terbatasnya benih bermutu. Secara konvensional, budidaya jahe dilakukan dengan menggunakan bibit dari potongan rimpang. Dengan cara ini diperlukan bibit dalam jumlah yang banyak, antara 2-3 t/ha untuk jahe yang dipanen tua dan 5-6 t/ha untuk yang dipanen muda. Kendala lain adalah penyakit tular benih layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum*. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mendapatkan benih jahe bebas penyakit adalah perbanyakan melalui kultur jaringan. Penelitian bertujuan untuk mengkaji sumber eksplan dari tingkat umur panen rimpang yang berbeda terhadap kapasitas pembentukan kalus embriogenik pada kultur meristem jahe putih besar. Penelitian dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik dari September 2007 sampai Maret 2008, menggunakan rancangan acak lengkap dengan 20 kali ulangan. Bahan tanaman yang digunakan adalah meristem jahe putih besar yang diambil dari rimpang panen muda dan tua. Peubah yang diamati meliputi: histologi jaringan, persentase kalus embriogenik yang terbentuk, bobot segar kalus, diameter kalus, dan morfologi kalus. Hasil penelitian menunjukkan adanya daerah meristematik pada sayatan eksplan meristem jahe putih besar ukuran $\pm 0,25$ cm. Persentase kalus embriogenik (92,1%) dan diameter kalus (0,59 mm) dari rimpang yang dipanen tua lebih tinggi dari yang dipanen muda. Berat kalus (1,18 g) dan jumlah embrio somatik globular (29,34) asal eksplan panen tua nyata lebih tinggi dari yang dipanen muda. Kalus embriogenik yang berasal dari eksplan rimpang yang dipanen tua mampu berkembang membentuk embrio somatik dan berkecambah menghasilkan planlet normal.

Kata kunci : *Zingiber officinale* Rose., umur rimpang, kalus embriogenik, embriogenesis somatik

ABSTRACT

Effect of explants age on the success of embryogenic calli formation in meristem culture of ginger (Zingiber officinale Rose.)

Constraint in ginger cultivation in Indonesia is the limited quality of planting materials. In conventional cultivation, planting materials were taken from a piece of rhizomes. By this technique, significant amount of planting materials is required, between 2-3 tons/ha for fully harvested and 5-6 tons/ha for young harvested rhizomes. Another serious constraint is bacterial wilt disease infection caused by *Ralstonia solanacearum*. Effort for obtaining free disease planting materials could be performed through tissue culture mass propagation. In this study, different ages of rhizome as explants sources was evaluated for their capacity in embryogenic calli

formation on the meristem culture of ginger. The experiment was conducted in Indonesian Medicinal and Aromatic Crops Research Institute from September 2007 to March 2008, using a completely random design with 20 replicates. Plant material used was white ginger meristem taken from the fully and young harvested rhizomes. The observed variables were explant histology, percentage embryogenic calli formation (%), fresh weight of calli, calli diameter, number of globular embryo, and calli morphology. The results showed a meristematic region at the incision explant big-white ginger meristem ± 0.25 cm in size. Percentage of embryogenic calli formation from the fully harvested rhizome-explant (92.1%) and calli diameter (0.59 mm) were higher than that of the younger one. Calli weight (1.18 g) and number of globular somatic embryos (29.34) from fully harvested rhizome-explants were significantly higher than that of the younger one. Embryogenic calli derived from the old harvested rhizome explants was able to grow well to form somatic embryos and then germinate to produce normal plantlet.

Key words : *Zingiber officinale* Rose, age of rhizome, embriogenic calli, somatic embryogenesis

PENDAHULUAN

Saat ini kendala dalam pengembangan jahe (*Zingiber officinale* Rose.) di Indonesia adalah terbatasnya bibit bermutu. Secara konvensional bibit jahe diambil dari potongan rimpang. Dengan cara ini diperlukan bibit dalam jumlah yang banyak, antara 2-3 t/ha untuk jahe yang dipanen tua dan 5-6 to/ha untuk yang dipanen muda (JANUWATI dan ROSITA, 1997). Kendala utama lain adalah serangan penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum*. Penyakit ini merupakan OPT utama yang dapat menggagalkan hasil dan sulit ditanggulangi karena di samping menyerang jahe, juga dapat menyerang tanaman temu-temuan lainnya seperti kunyit dan kencur, sayuran (tomat dan cabe), serta beberapa macam gulma (SUPRIADI *et al.*, 1995).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mendapatkan benih bermutu adalah dengan menggunakan sumber bibit bebas penyakit, seperti penggunaan bibit yang dihasilkan melalui teknik kultur jaringan. Menurut

BHOJWANI dan RAZDAN (1996) kultur jaringan memiliki potensi yang besar sebagai suatu cara propagasi vegetatif bagi tanaman ditinjau dari segi ekonomi.

Regenerasi tanaman dengan menggunakan teknik kultur jaringan dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik. Perbanyakkan tanaman dengan menggunakan teknik kultur jaringan melalui jalur embriogenesis somatik lebih menguntungkan dibandingkan melalui organogenesis karena dapat menghasilkan tanaman baru dengan jumlah yang lebih banyak. Selain itu, karena embriosomatik berasal dari sel tunggal maka akan lebih mudah untuk memonitor proses pertumbuhan setiap individu tanaman. Embriogenesis somatik juga merupakan jalur yang lebih efisien untuk penelitian yang melibatkan produksi tanaman yang ditransformasikan secara genetik (JIMENEZ, 2001).

Proses embriogenesis dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain adalah genotipe tanaman, sumber eksplan, komposisi media, zat pengatur tumbuh dan keadaan fisiologi sel (TERZI dan LOSCHIAVO, 1990; EHSANPOUR, 2002). Pada kultur jaringan, sumber dan umur eksplan merupakan faktor yang sangat penting dalam menentukan kemampuan kalus menghasilkan embrio somatik (STONE *et al.*, 2002). Beberapa penelitian terdahulu telah berhasil menginduksi dan meregenerasikan tanaman dari berbagai sumber umur eksplan melalui embriogenesis somatik. Penggunaan sumber eksplan daun aseptik, antera dan meristem (*inner shoot bud*) dari jahe putih besar var. Cimanggu-1, menunjukkan bahwa eksplan asal meristem memberikan potensi regenerasi lebih baik dari daun aseptik dan antera pada media tumbuh yang diaplikasikan untuk menginduksi embriogenesis somatik (SYAHID dan ROSTIANA, 2007; SITINJAK, 2005; ROSTIANA *et al.*, 2002).

Jaringan meristematik yang digunakan sebagai sumber eksplan dalam kultur meristem dapat berupa meristem apikal atau meristem tunas aksiler. Kultur meristem digunakan untuk mengeliminasi virus, untuk memperoleh pengetahuan tentang peranan nutrisi dan hormone terhadap diferensiasi serta pertumbuhan embri-somatik maupun tunas, dan untuk diaplikasikan untuk menyimpan plasma nutfah (SAHRAWAT dan CHAND, 2001).

Menurut ROSTIANA, (2007) ukuran meristem untuk kultur *in vitro* jahe paling efektif berkisar antara 0,25-0,5 cm, yang diperoleh dari tunas berukuran sedang, semakin besar ukuran tunas, semakin tebal lapisan/seludang (bakal daun) yang menutupi *apical dome* (meristem apikal). Sedangkan tunas yang berukuran lebih kecil, seludangnya tidak terlalu banyak, sehingga memudahkan dalam mengisolasi meristem dan persentase eksplan membentuk kalus pun lebih tinggi.

Sumber eksplan yang biasa digunakan dalam perbanyakkan kultur jaringan jahe adalah rimpang dari umur panen 4 - 10 bulan. Kondisi rimpang dengan umur panen yang berlainan berbeda dalam tekstur, kandungan air, serat dan pati. Kondisi tersebut akan berpengaruh terhadap sifat

fisiologis dan kemampuan tumbuh. Sampai saat ini belum diketahui pengaruh perbedaan umur panen rimpang, terhadap tingkat keberhasilan menginduksi kalus embriogenik dan proses embriogenesis somatik pada kultur *in vitro* jahe. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji perbedaan umur panen dari rimpang jahe putih besar yang digunakan sebagai sumber eksplan dan pengaruhnya terhadap proses pembentukan dan pertumbuhan kalus embriogenik pada kultur meristem jahe.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan mulai bulan September 2007 sampai Maret 2008 di Laboratorium Kultur Jaringan, Kelti Plasma Nutfah dan Pemuliaan, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. Pengamatan anatomi kalus dilakukan di Laboratorium Mikroteknik Departemen Biologi, Fakultas MIPA, IPB.

Bahan tanaman yang digunakan adalah meristem jahe putih besar (*inner shoot bud*) var. Cimanggu 1 yang diambil dari rimpang umur 4 bulan dan 8 bulan. Meristem disterilisasi menggunakan larutan marsal 2%, dithane 2 g/l, dan agrimisin 2 g/l masing-masing selama 1 jam, alkohol 70% dan HgCl₂ 0,2% selama 5 menit, klorox 20% selama 8 menit, dan terakhir dibilas air steril. Setelah aseptik meristem dikulturkan di dalam medium MS (MURASHIGE dan SKOOG, 1962) dengan penambahan 2% sukrosa, 100 mg/l glutamin, 1,0 mg/l 2,4-D, dan 3,0 mg/l BA.

Setelah selesai pengkulturan, botol kultur diletakkan pada ruang inkubasi pada suhu $\pm 27^{\circ}\text{C}$. Rak inkubasi diselimuti dengan kain berwarna hitam untuk menghindari masuknya cahaya.

Kalus embriogenik yang terbentuk pada tahap inisiasi kalus dicacah kemudian disubkultur ke media yang sama untuk melihat pertambahan bobot segar dan diameter kalus. Kalus sebelum disubkultur ditimbang menggunakan timbangan analitik seberat 0,5 g per botol.

Untuk menginduksi stuktur embrio globular, kalus yang berasal dari medium induksi (tahap I) disubkultur ke media tahap II yaitu media dasar MS + 3% manitol. Embrio yang dihasilkan pada tahap II disubkultur ke media pendewasaan yaitu media MS + 6% Sukrosa (tahap III).

Penelitian disusun dalam rancangan acak lengkap dengan satu faktor perlakuan umur panen sumber eksplan. Perlakuan umur panen rimpang sebagai sumber eksplan terdiri atas 2 taraf yaitu ; panen muda (umur 4 bln) dan panen tua (umur 8 bln). Pada tahap awal inisiasi kalus disiapkan 75 botol untuk setiap sumber eksplan. Sedangkan pada tahap perbanyakkan kalus embriogenik jumlah ulangan 20 botol/perlakuan.

Peubah yang diamati meliputi: (1) histologi sumber eksplan, (2) jumlah kalus yang terbentuk (%), (3) bobot segar kalus, (4) diameter kalus, dan (5) morfologi kalus.

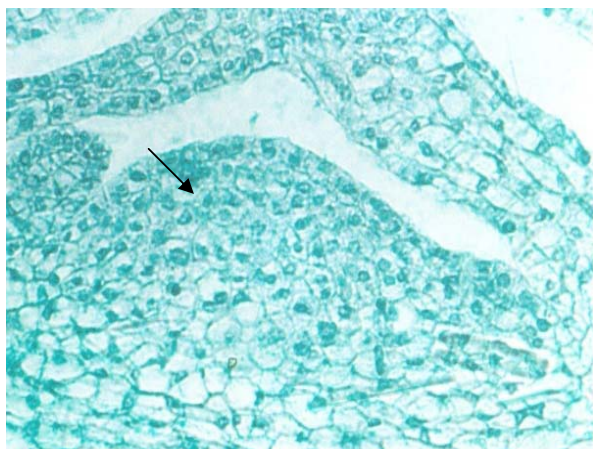
Histologi sumber eksplan dilakukan dengan menggunakan metode NAKAMURA (1995). Jumlah kalus yang terbentuk diamati pada saat eksplan berumur 8 minggu setelah tanam. Persentasi jumlah kalus yang berhasil terbentuk dihitung dibandingkan dengan jumlah eksplan yang ditanam.

Bobot kalus ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik sementara diameter kalus diukur dengan mengukur panjang kalus terpanjang dan kalus terlebar 2 minggu setelah disubkultur. Sementara morfologi kalus dilihat dengan memperhatikan tekstur kalus dan warna kalus yang terlihat pada tiap tahapan perkembangan kalus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Histologi Jaringan

Hasil sayatan eksplan meristem jahe putih besar ukuran $\pm 0,25$ cm terlihat adanya daerah meristematik (Gambar 1). Menurut SHERWOOD (1996), penggunaan jaringan meristematik dapat mengeliminasi virus sampai 100%, sehingga dapat mengurangi tingkat kontaminasi. Namun semakin kecil ukurannya, kekuatan untuk bertahan hidup semakin rendah. STONE *et al.* (2002) menyatakan, pada proses kultur jaringan, sumber eksplan merupakan salah satu faktor yang berpengaruh dalam menentukan kemampuan kalus untuk menghasilkan embrio somatik.



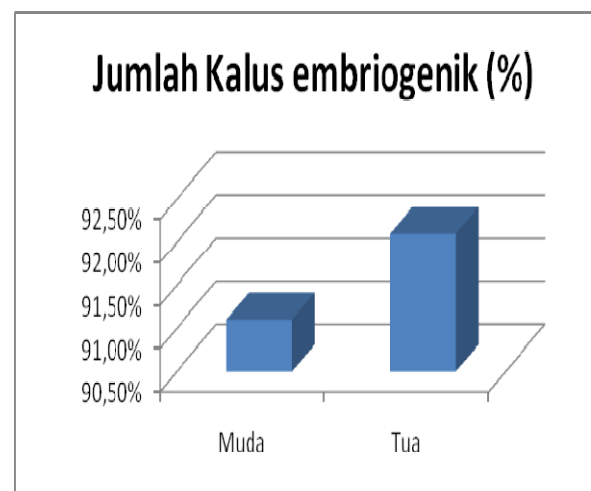
Gambar 1. Penampang membujur jaringan meristem jahe putih besar (Pembesaran 4 x 10). Tanda panah memperlihatkan jaringan meristematik

Figure 1. Cross-section of big-white ginger meristem (4 x 10 enlargement). Arrowed : meristematic tissue

Jumlah Kalus yang Terbentuk

Eksplan yang dikulturkan dalam médium induksi kalus mulai menunjukkan pembengkakan di sekitar meristem pada saat ± 2 minggu setelah dikulturkan. Mulainya inisiasi kalus yang ditandai dengan pembengkakan ini tidak berbeda nyata antara eksplan tua dan muda. Pembengkakan ini kemudian disusul dengan terbentuknya kalus pada tepi dasar meristem pada minggu ketiga. Pada minggu kedelapan diharapkan semua eksplan membentuk kalus embriogenik. Tetapi kenyataannya ada juga eksplan yang tidak berhasil membentuk kalus embriogenik dengan presentase 8,9% pada jahe panen muda dan 7,9% pada panen tua (Gambar 2).

Kegagalan eksplan membentuk kalus diduga akibat rusaknya meristem sewaktu diisolasi atau dikarenakan perbedaan kemampuan jaringan menyerap unsur hara dan zat pengatur tumbuh dalam media inisiasi, sehingga kalus yang dihasilkan tidak embriogenik yang ditandai dengan tekstur kalus yang cenderung kompak. Media induksi kalus yang mengandung 2% sukrosa, 100 mg/l glutamin, 1,0 mg/l 2,4-D, dan 3,0 mg/l BA berhasil menginduksi kalus embriogenik jahe baik pada perlakuan eksplan asal rimpang yang dipanen tua maupun muda. Menurut RAGHAVAN (1986), auksin meningkatkan kuantitas sel-sel embriogenik dengan cara memacu pembelahan sel untuk membentuk massa proembriogenik, serta mencegah inisiasi pertumbuhan yang teratur pada sel-sel tersebut. Penambahan glutamin yang merupakan sumber nitrogen organik dapat meningkatkan kemampuan embriogenesis (HU dan GUO, 1999).

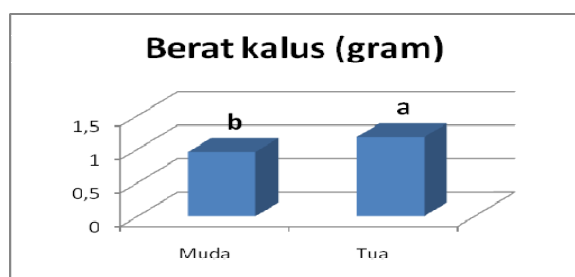


Gambar 2. Presentase kalus embriogenik jahe putih besar minggu kedelapan setelah kultur pada media MS + 2% sukrosa + 100 mg/l glutamin + 1,0 mg/l 2,4-D + 3,0 mg/l BA

Figure 2. Percentage of big-white ginger embryogenic calli at eighth weeks after culture on medium MS + 2% sukrosa + 100 mg/l glutamin + 1,0 mg/l 2,4-D + 3,0 mg/l BA

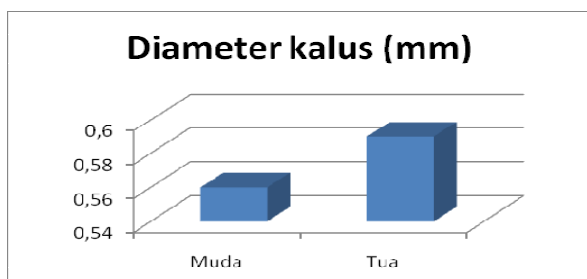
Bobot Segar dan Diameter Kalus

Berat kalus yang sebelumnya 0,5 gram per botol, setelah 2 minggu menunjukkan pertambahan berat dan diameternya (Gambar 3). Berdasarkan uji statistik terlihat perbedaan nyata antara berat kalus asal eksplan rimpang yang dipanen tua dan panen muda, sedangkan untuk diameter kalus tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata. Kalus yang terbentuk berwarna putih kekuningan (Gambar 4). Perbedaan kemampuan pembentukan kalus embriogenik yang lebih banyak pada perlakuan eksplan asal rimpang yang dipanen tua, ternyata berpengaruh terhadap berat kalus dan diameter kalus yang terbentuk. Hal ini diduga karena adanya pengaruh hormon endogen di dalam tanaman. Diketahui bahwa hormon di dalam tanaman merupakan produk metabolit, sehingga kandungan hormon endogen di dalam tanaman akan berbeda jika umur tanaman berbeda (KAUFMAN *et al.*, 1999). Semakin tua umur tanaman akumulasi jumlah metabolit sekunder dalam hal ini hormon endogen akan semakin banyak tersimpan di dalam sel tanaman.



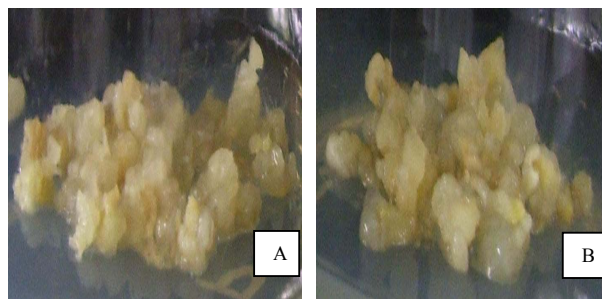
Gambar 3. Berat kalus jahe putih besar 2 minggu setelah disubkultur pada media MS + 2% sukrosa +100 mg/l glutamin +1,0 mg/l 2,4-D + 3,0 mg/l BA

Figure 3. Calli weight of big-white ginger at two weeks after subcultured on Medium MS + 2% sukrosa + 100 mg/l glutamin + 1.0 mg/l 2,4-D + 3.0 mg/l BA



Gambar 4. Diameter kalus jahe putih besar 2 minggu setelah disubkultur pada media MS + 2% sukrosa +100 mg/l glutamin +1,0 mg/l 2,4-D + 3,0 mg/l BA

Figure 4. Calli diameter of big-white ginger at two weeks after subcultured on medium MS + 2% sukrosa +100 mg/l glutamin +1.0 mg/l 2,4-D + 3.0 mg/l BA

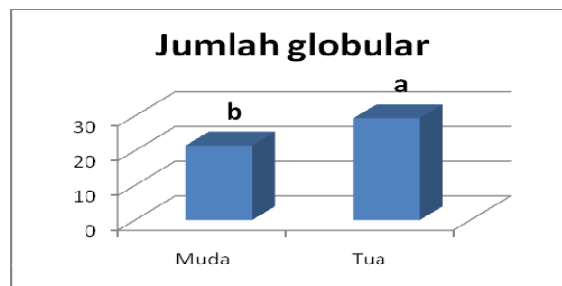


Gambar 5. Kalus embriogenik jahe putih besar umur 10 minggu setelah tanam pada media MS + 2% sukrosa +100 mg/l glutamin +1,0 mg/l 2,4-D + 3,0 mg/l BA. A. Panen tua. B. Panen muda

Figure 5. Embryogenic calli of big-white ginger at 10 weeks after subculture on medium MS + 2% sukrosa +100 mg/l glutamin + 1.0 mg/l 2,4-D + 3.0 mg/l BA. A. Fully harvested rhizome. B. Young harvested

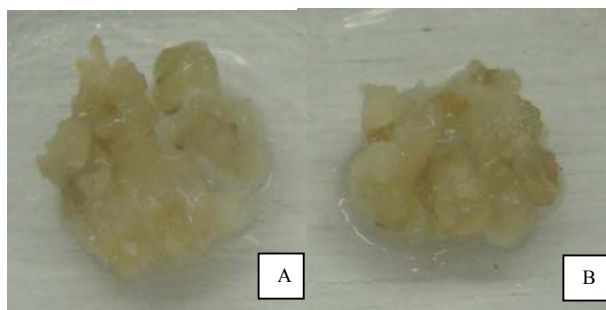
Proliferasi Kalus Embriogenik

Dari pengamatan pada minggu pertama setelah ditransfer, induksi embrio globular berhasil didapat pada kedua jenis asal eksplan yang digunakan, dengan jumlah embrio globular eksplan asal rimpang yang dipanen tua lebih banyak dibandingkan panen muda (Gambar 6). Menurut BROSEMA *et al.* (1997), kalus embriogenik friabel (remah) yang disubkultur dari medium induksi, pada beberapa minggu akan memperlihatkan embrio somatik bentuk globular. Embrio globular yang terbentuk berbeda nyata antara asal eksplan rimpang yang dipanen tua dan muda. Panen tua menghasilkan embrio globular yang lebih banyak dibandingkan dengan panen muda (Gambar 7). Perbedaan tersebut terjadi diduga akibat adanya perbedaan jumlah kandungan hormon endogen dan jumlah karbohidrat endogen (pati) di dalam tanaman. Kemampuan pembentukan embrio globular dipengaruhi oleh banyak faktor di antaranya: jumlah auksin, sitokinin, ABA, karbohidrat (GEORGE *et al.*, 2008; OCHATT dan POWER, 1992).



Gambar 6. Jumlah embrio globular jahe putih besar pada media MS + 3% manitol.

Figure 6. Embryos globular number of big-white ginger on the media at MS + 3% manitol

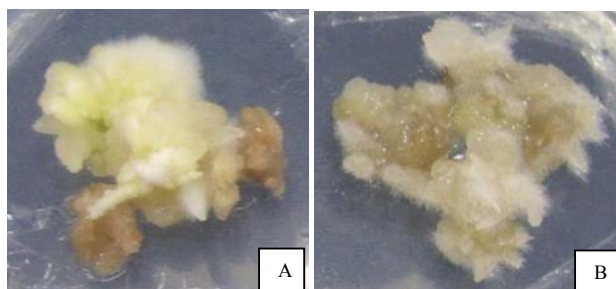


Gambar 7. Embrio globular jahe putih besar yang terbentuk pada media MS + Manitol 3%. A. Panen tua. B. Muda
 Figure 7. Globular embryo of big-white ginger formation on MS + Manitol 3 %. Medium. A. Fully harvested rhizome. B. Young harvested

Pendewasaan dan Perkecambahan Embrio Somatik

Pada media pendewasaan (media MS + 6% sukrosa) kemampuan embrio globular membentuk embrio torpedo mulai terlihat sejak 1 minggu setelah subkultur dan bertambah sampai minggu ke-3. Kalus pada medium pendewasaan embrio pada minggu kedua memperlihatkan adanya bulu-bulu halus di permukaan embrio. Embrio somatik dewasa ada yang memiliki kemampuan membentuk kutub tunas dan akar. Namun sebagian besar menunjukkan pembentukan bakal apikal akar lebih menonjol dibandingkan meristem tunas. Jumlah apikal akar pada jahe asal eksplan yang dipanen tua terlihat lebih banyak dibandingkan dengan panen muda (Gambar 8).

Sel-sel yang diambil dari bagian tanaman yang masih muda dan yang sudah dewasa ternyata memiliki karakteristik yang berbeda. Pada tanaman *Hedera helix*, kalus yang diperoleh dari jaringan juvenil ternyata lebih mudah membentuk tunas adventif sementara jaringan dewasa lebih banyak membentuk kalus embriogenik (GEORGE dan SHERINGTON, 1984).



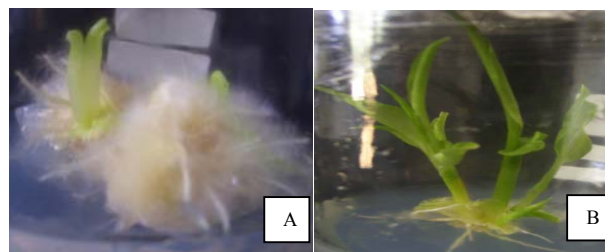
Gambar 8. Apikal akar jahe putih besar yang terbentuk pada media pendewasaan embrio (MS + 6% sukrosa). A. Panen tua. B. Panen muda
 Figure 8. Performance of root apical big-white ginger on embryo maturation medium (MS + 6% sukrosa). A. Fully harvested rhizome. B. Young harvested

Untuk memaksimalkan pertumbuhan embrio torpedo menjadi kecambah normal, maka embrio tersebut dipindahkan ke media tahap IV yang disebut dengan media perkecambahan dengan komposisi media MS + BA 0,1 mg/l + GA 0,5mg/l Eksplan awal yang berasal dari panen tua berhasil membentuk kecambah normal rata-rata 3 kecambah per 0,5 gram berat kalus awal, sedangkan yang berasal dari panen muda tidak memberikan respon positif, hanya membentuk akar saja. Perkecambahan dan perkembangan sel dalam proses kultur jaringan sangat dikendalikan oleh keseimbangan dan interaksi dari hormon serta kandungan metabolik sekunder yang berada di dalam jaringan meristematis (eksplan). Zat pengatur tumbuh pada eksplan sendiri tergantung dari hormon endogen dan hormon eksogen yang diserap dari media tumbuh (FINKELSTEIN, 2008). Di samping itu benih yang dipanen sebelum mencapai umur fisiologisnya tidak mempunyai viabilitas tinggi. Hal ini diduga karena benih belum mempunyai cadangan makanan yang cukup dan pembentukan embrio yang belum sempurna (SUCIATY, 2010).

Selanjutnya bakal tunas yang diperoleh pada tahap IV dipindahkan ke tahap V yaitu tahapan pemanjangan tunas dengan menggunakan media MS tanpa zat pengatur tumbuh. Secara morfologi, penampilan planlet terlihat normal (Gambar 9).

KESIMPULAN

Kemampuan eksplan membentuk kalus embriogenik, bobot kalus dan pembentukan embrio globular, dipengaruhi oleh tingkat ketuaan umur rimpang pada kultur meristem jahe putih besar. Eksplan terbaik untuk dijadikan sumber eksplan pada kultur meristem jahe putih besar adalah rimpang yang dipanen tua (8 bulan). Kalus embriogenik yang berasal dari eksplan rimpang yang dipanen tua, mampu berkembang membentuk embrio somatik dan berkecambah menghasilkan planlet normal.



Gambar 9. Perkecambahan kalus embriogenik asal eksplan rimpang jahe putih besar yang dipanen tua, didalam media MS + BA 0,1 mg/l + GA 0,5 mg/l (A). Planlet jahe normal yang dihasilkan melalui proses embriogenesis somatik (B)
 Figure 9. Germinated embryogenic calli derived from big-white ginger fully harvested rhizome-explant on MS + BA 0.1 mg/l + GA 0.5 mg/l medium (A). Normal planlet of big-white ginger from Embryogenesis somatic (B)

DAFTAR PUSTAKA

- BHOJWAN, S. and M.K. RAZDAN. 1996. Plant tissue culture: Theory and practice. Elsevier Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo. 767p.
- BRONSEMA, F. B. F., V. W. J. E. OSTVEEN, and V. A. A. M. LAMMERAN. 1997. Comparative analysis of callus formation and regeneration on cultured immature maize embryos of the inbred lines A188 and A632. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. (50) : 57-65.
- EHSANPOUR, A. A. 2002. Induction of somatic embryogenesis from endosperm of oak (*Quercus castanifolia*). In A. TAJI and R. WILLIAMS (ed.). The importance of plant tissue culture and biotechnology in plant science. Univ. of New England Unit, Australia. p.273-277.
- FINKELSTEIN, R. R. 2004. The Role of Hormones During Development and Germination. In DAVIES, P.J. 2004. Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!. Kluwer Academic Publishers. Fordrecht/Boston/London. pp.513-537.
- GOERGE, E. F., M. A. HALL, and G. J. De KLERK. 2008. Plant propagation by Tissue Culture 3rd. Edition Volume 1., The Background Published by Springer, P.O. Box 17, 330 AA Dordrecht, The Netherlands. 504p.
- GEORGE, E. F. and P.D. SHERINGTON. 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd, England.
- HU, H. and X. GUO. 1999. *In vitro* induced haploids in plant genetic and breeding. In SOH and BHOJWANI (Eds) Morphogenesis in Plant Tissue Culture (. Kulwer Academic Press. London. 329-361.
- JANUWATI, M. and S.M.D. ROSITA. 1997. Perbanyakan benih jahe. In N. AJIAH *et al.* (Ed). Monograf Jahe. No.3. Balittro. Bogor. p.40-50.
- JIMENEZ, V.M. 2001. Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. R. Bras. Fisiol. Veg. 13(2): 196-223.
- KAUFMAN, P.B., L.J. CSEKE, S. WARBER, J.A. DUKE. and H.L. BRIELMAN. 1991. Natural Products from Plants. CRC Press. Boca Raton, Boston, London, New York, Washington D.C. 343p.
- NAKAMURA, T. 1995. Method for cells and tissues observation. In T. HASHIBA T AND K. HINATA (Eds.) A manual experiments for plant biology. Tokyo : Soft science publication. p. 15-34.
- OCHATT, S.J. and J.B. POWER. 1992. Plant regeneration from cultured protoplasts of higher plants. In M.W. FOWLER and G.S. WARREN (Eds.). Plant biotechnology second supplement. Pergamon Press, Oxford, New York, Sequel, Tokyo. p.100-123.
- RAGHAVAN, V. 1986. Embryogenesis in angiosperms : A developmental and experimental study. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- ROSTIANA, O., S.F. SYAHID, D. SESWITA., S.M.D. ROSITA, AMALIA, S. AISYAH, dan D. SURAHMAN. 2002. Regenerasi *in Vitro* Jahe melalui Kultur Anther dan Embrio Somatik. Laporan Penelitian Balittro.p.122-137.
- ROSTIANA, O. 2007. Peningkatan Kapasitas Regenerasi Kultur Meristem Jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) Melalui Embriogenesis Somatik untuk Menghasilkan Benih Sehat Berimpang Normal. Laporan Akhir Program Insentif Riset Terapan, Kementrian Negara Riset dan Teknologi. 29p.
- SAHRAWAT, H.F. and S. CHAND. 2001. Continuous somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyls segments *Psoralea corylifolia* Linn. An endangered and medicinally important fabaceae plant. *Curr. Sci.*81(10):1328-1331.
- SHERWOOD, J.L. 1996. Virus-free plants. In. R.A. DIXON and R.A. GONZALES (ed.) Plant cell culture : A practical approach. Second edition. Oxford Univ. Pres, Oxford, New York, Tokyo. p.15-145.
- SITINJAK, R.R. 2005. Potensi regenerasi kultur meristem jahe (*Zingiber officinale* Rosc.) melalui embriogenesis somatik. Disertasi Program Pasca Sarjana. Universitas Pajajaran Bandung (Unpublished).
- STONE, L.J., M.C. COMB, and K. SEATON. 2002. Propagation of blue flowered conospermum species. In A. TAJI and R. WILLIAMS (Eds.). The importance of plant tissue culture and biotechnology in plant sciences. Univ. of New England Unit, Australia. p.351-353.
- SUCIATY, T. 2010. Pengaruh umur panen pada tiga cultivar padi (*Oryza sativa* L.) terhadap viabilitas benih. faperta-unswagati.com/pdf/pdfv4/1.pdf -
- SUPRIADI, J. G. ELPHINSTONE, S. J. EDEN-GREEN, and S.Y. HARTATI. 1995. Physiological, serological and pathological variation amongst isolates of *Pseudomonas solanacearum* from ginger and other hosts in Indonesia. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. 1(2): 88-98.
- SYAHID, S.F. and O. ROSTIANA. 2007. Pengaruh Sumber Eksplan Terhadap Induksi Kalus Embriogenik Pada Kultur *In vitro*. Seminar PERSADA 2007. IPB. Bogor.p.304.
- TERZI, M. and F. LOSCHIAVO. 1990. Somatic embryogenesis. In S.S. Bhojwani (ed.) Plant tissue culture: Applications and Limitations. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo. p.55-66.